

PRÁCTICAS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA: BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA



M^a PAZ MERINO JIMÉNEZ
MIREIA LLINARES MARCELO

PRÁCTICAS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA: BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA

A mi padre.

M. Paz Merino

A los tres hombres más importantes que
han pasado por mi vida.

M. Llinares

Agradecemos a los doctores S. Simeon y E. Collado por el importante aporte que han hecho con la documentación cedida desinteresadamente para la realización de nuestro libro.

Agradezco como profesora de la Rama Sanitaria, la gran ayuda que para mi ha supuesto la utilización de su libro “PRACTICAS DE MICROBIOLOGÍA” para la impartición de mis clases en el laboratorio de Microbiología en los centros educativos donde he ejercido la docencia referente a dicho laboratorio. Ha sido una guía inmensamente eficaz para la organización de mi trabajo. Gracias nuevamente por vuestra ayuda

M^a PAZ MERINO JIMÉNEZ

Profesor técnico de formación profesional

Especialidad procedimientos de diagnóstico clínico y ortoprotésico

MIREIA LLINARES MARCELO

Técnico superior en laboratorio de diagnóstico clínico

Primera edición, 2012

Autoras: M^ª Paz Merino Jiménez y Mireia Llinares Marcelo

Maquetación: Patricia Penavella Soto

Edita: Educàlia Editorial, S.L.

Imprime: Ulzama

ISBN: 978-84-15161-87-5

Depòsit Legal: V-2442-2012

Printed in Spain/Impreso en España.

Todos los derechos reservados. No está permitida la reimpresión de ninguna parte de este libro, ni de imágenes ni de texto, ni tampoco su reproducción, ni utilización, en cualquier forma o por cualquier medio, bien sea electrónico, mecánico o de otro modo, tanto conocida como los que puedan inventarse, incluyendo el fotocopiado o grabación, ni está permitido almacenarlo en un sistema de información y recuperación, sin el permiso anticipado y por escrito del editor.

Alguna de las imágenes que incluye este libro son reproducciones que se han realizado acogiéndose al derecho de cita que aparece en el artículo 32 de la Ley 22/18987, del 11 de noviembre, de la Propiedad intelectual. Educàlia Editorial agradece a todas las instituciones, tanto públicas como privadas, citadas en estas páginas, su colaboración y pide disculpas por la posible omisión involuntaria de algunas de ellas.

Educàlia Editorial, S.L.

Avda de les Jacarandes 2 loft 327 46100 Burjassot-València

Tel. 960 624 309 - 963 768 542 - 610 900 111

E-Mail: educaliaeditorial@e-ducalia.com

<http://www.e-ducalia.com/material-escolar-colegios-ies.php>

ÍNDICE DE PRÁCTICAS

- **PRÁCTICA 1. MANEJO DEL MICROSCOPIO.**
- **PRÁCTICA 2. DISTRIBUCIÓN DE MICROORGANISMOS EN LA NATURALEZA.**
 - Parte A. Visualización de agua estancada.
 - Parte A.2. Visualización de suspensión de tierra.
 - Parte B. Visualización de un alimento contaminado.
- **PRÁCTICA 3. RECONOCIMIENTO DE MATERIAL.**
- **PRÁCTICA 4. ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO.**
- **PRÁCTICA 5. ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO.**
- **PRÁCTICA 6. ACTIVIDADES DE ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN.**
- **PRÁCTICA 7. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.**
 - 7.1. Preparación de agar nutritivo en tubo.
 - 7.2. Preparación de yeme en tubo.
 - 7.3. Preparación de TSA en tubo.
 - 7.4. Preparación de Mc Conckey en placa.
 - 7.5. Preparación de CLED en placa.
 - 7.6. Preparación de Sabouraud en placa.
 - 7.7. Preparación de agar Columbia en placa.
 - a) Preparación de agar chocolate.
 - b) Preparación de agar sangre.
 - 7.8. Preparación de medio O/F en tubo.
 - 7.9. Preparación de agua de peptona.
 - 7.10. Preparación de medio AHK en tubo.
 - 7.11. Preparación de caldo nitrado.
 - 7.12. Preparación de medio Christensen en tubo.
 - 7.13. Preparación de medio Falcow.
 - 7.14. Preparación de medio Clark y Lubs o VRMP.
 - 7.15. Preparación de medio Citrato de Simmons en tubo.
 - 7.16. Preparación de Mueller Hinton en placa.
- **PRÁCTICA 8. TÉCNICAS DE SIEMBRA Y AISLAMIENTO.**
 - 8.1. Técnica de Kirby Bauer.
 - 8.2. Técnica de siembra por inundación.
 - 8.3. Técnica de zig-zag.
 - 8.4. Técnica de estrías múltiples.
 - 8.5. Técnica de los cuatro cuadrantes.
 - 8.6. Técnica de los tres giros.
 - 8.7. Técnica de estría en superficie inclinada.
 - 8.8. Técnica de picadura en superficie inclinada.
 - 8.9. Morfología macroscópica de las colonias.

- **PRÁCTICA 9.** URINOCULTIVO.
- **PRÁCTICA 10.** PLEGADO DE UN FILTRO.
- **PRÁCTICA 11.** TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN DE GÉRMENES VIVOS.
- **PRÁCTICA 12.** PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y COLORANTES PARA TINCIÓNES SIMPLES.
 - 12.1. Azul de metileno.
 - 12.2. Fucsina fenicada básica.
 - 12.3. Nigrosina.
- **PRÁCTICA 13.** PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y COLORANTES PARA TINCIÓNES DIFERENCIALES. TINCIÓN DE GRAM.
 - 13.1. Violeta de genciana.
 - 13.2. Lugol.
 - 13.3. Decolorante de Gram.
 - 13.4. Fucsina diluida.
 - 13.5. Safranina.
- **PRÁCTICA 14.** PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y COLORANTES PARA TINCIÓNES DIFERENCIALES. TINCIÓN ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENCIA.
 - 14.1. Fucsina fenicada de Ziehl Neesen.
 - 14.2. Alcohol clorhídrico.
 - 14.3. Azul de metileno de Ziehl Neesen.
- **PRÁCTICA 15.** PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y COLORANTES PARA TINCIÓNES ESTRUCTURALES. TINCIÓN DE ESPORAS.
 - 15.1. Verde malaquita.
 - 15.2. Solución acuosa de safranina.
- **PRÁCTICA 16.** PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y COLORANTES PARA TINCIÓNES ESTRUCTURALES. TINCIÓN DE CÁPSULAS.
 - 16.1. Nigrosina.
 - 16.2. Fucsina diluida.
- **PRÁCTICA 17.** REALIZACIÓN DE UNA TINCIÓN SIMPLE.
- **PRÁCTICA 18.** REALIZACIÓN DE UNA TINCIÓN NEGATIVA.
- **PRÁCTICA 19.** REALIZACIÓN DE UNA TINCIÓN DE GRAM.
- **PRÁCTICA 20.** REALIZACIÓN DE UNA TINCIÓN DE ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENCIA O DE ZIEL NEESEN.
- **PRÁCTICA 21.** REALIZACIÓN DE UNA TINCIÓN DE ESPORAS.
- **PRÁCTICA 22.** REALIZACIÓN DE TINCIÓN DE CÁPSULAS. MÉTODO DE BURRI O DE LA TINTA CHINA.

- **PRÁCTICA 23. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.**
 - 23.1. Metabolismo hidrocarbonado.
 - 23.1.1. Prueba óxido-fermentativa de Hugg y Leiffson.
 - 23.1.2. Prueba de producción de ácido y gas.
 - 23.1.3. Prueba b-d-galactosidasa (ONPG).
 - 23.2. Enzimáticas.
 - 23.2.1. Prueba de la oxidasa.
 - 23.2.2. Prueba de la catalasa.
 - 23.2.3. Prueba de reducción de nitratos.
 - 23.2.4. Prueba ureasa.
 - 23.2.5. Prueba de la coagulasa.
 - 23.3. Metabolismo de las proteínas.
 - 23.3.1. Hidrólisis de gelatina.
 - 23.3.2. Prueba de las descarboxilasas.
 - 23.4. Sistemas multiprueba.
 - 23.4.1. Prueba AHK.
 - 23.4.2. Prueba IMVIC.
 - Prueba del Indol.
 - Prueba rojo de metilo.
 - Prueba Voges Proskauer.
 - Prueba citrato.
 - 23.4.3. Sistema en tira y tubo.
 - Sistema de tiras API.
 - Sistema en tubo (Enterotube).

- **PRÁCTICA 24. ANTIBIOGRAMA POR LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN DISCO.**

- **PRÁCTICA 25. SIEMBRA EN CONDICIONES ANAEROBIAS.**

- **PRÁCTICA 26. TÉCNICA DE SIEMBRA DE HONGOS. TÉCNICA DEL PORTAOBJETOS.**

- **PRÁCTICA 27. TÉCNICA DE SIEMBRA DE HONGOS. TÉCNICA DEL CUADRADITO DE AGAR.**

- **PRÁCTICA 28. TÉCNICA DE SIEMBRA DE HONGOS. TÉCNICA DE HOYO EN PLACA.**

- **PRÁCTICA 29. TÉCNICA DE SIEMBRA DE HONGOS. TÉCNICA DEL CUBRE INCLINADO EN PLACA.**

- **PRÁCTICA 30. TÉCNICA DE SIEMBRA DE HONGOS. TÉCNICA DE LA GOTA PENDIENTE.**

- **PRÁCTICA 31. TÉCNICA DE VISUALIZACIÓN DE HONGOS. VISUALIZACIÓN DIRECTA CON LA TÉCNICA DE LA CINTA ADHESIVA.**

PRÁCTICA 26. TÉCNICA DE SIEMBRA DE HONGOS. TÉCNICA DEL PORTAOBJETOS.

VISIÓN MACROSCÓPICA

MATERIAL

- Alcohol.
- Mechero Bunsen.
- Portaobjetos.
- Placa Petri.
- Papel filtro.
- Agua destilada.
- Medio de cultivo Agar Sabouraud.
- Pipeta Pasteur estéril.
- Asa de siembra.
- Muestra de hongos.
- Estufa Pasteur.

TÉCNICA

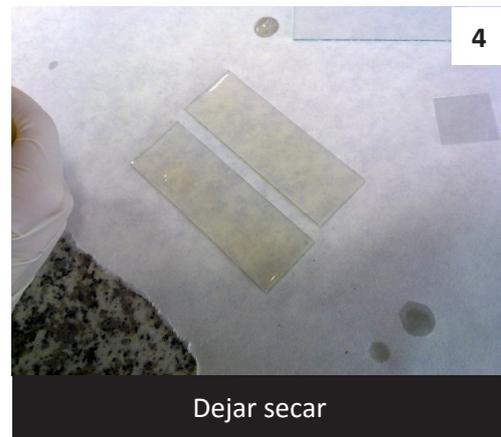
- 1º. Preparar 100 ml de medio de cultivo Agar Sabouraud estéril (práctica 7.6).
- 2º. Limpiar el portaobjetos con alcohol, secar y flamear.
- 3º. Cubrir el portaobjetos con una fina capa de medio de cultivo (todavía en estado líquido) con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril.
- 4º. Dejar secar el medio.
- 5º. Recortar un círculo de papel de filtro de la misma medida que la placa de Petri.

- 6°. Colocar en el fondo de la placa y humedecerlo con un poco de agua destilada para mantener el ambiente húmedo para el crecimiento del hongo.
- 7°. Con el asa de siembra esterilizada y humedecida con agua estéril tomar un poco de muestra de hongo.
- 8°. Colocar la muestra en el centro del portaobjetos realizando un pequeño movimiento circular con el asa.
- 9°. Colocar el portaobjetos en la placa de Petri.
- 10°. Incubar a 25°C el tiempo necesario para el crecimiento del hongo.

RESULTADOS

- Indica con una fotografía el resultado obtenido.
- Explica lo que observas.

PROCEDIMIENTO EN IMÁGENES



VISIÓN MICROSCÓPICA

MATERIAL

- Cubreobjetos.
- Pipeta Pasteur.
- Colorante azul de lactofenol.
- Muestra ya incubada (técnica del portaobjetos).
- Pinzas.
- Mechero Bunsen.
- Microscopio.

TÉCNICA

- 1º. En el portaobjetos donde habíamos realizado la técnica, echamos una gota de azul de lactofenol.
- 2º. Poner un cubreobjetos encima.
- 3º. Observar al microscopio a 40x.

PROCEDIMIENTO EN IMÁGENES



RESULTADOS

- Indica con una fotografía el resultado microscópico obtenido.
- Explica lo que observas.

PRÁCTICA 27. TÉCNICA DE SIEMBRA DE HONGOS. TÉCNICA DEL CUADRADITO DE AGAR.

VISIÓN MACROSCÓPICA

MATERIAL

- Alcohol.
- Mechero Bunsen.
- Placa Petri con medio agar Sabouraud.
- Bisturí.
- Pinzas.
- Asa de siembra.
- Muestra con hongos.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Placa Petri vacía.
- Papel filtro.
- Agua destilada.
- 2 capilares de microhematocrito.
- Estufa.
- Regla.
- Tijeras.

TÉCNICA

- 1º. Dibujar en un papel un cuadradito de 1'5x1'5 cm. Colocar sobre el papel la placa con agar Sabouraud y cortar un cuadrado siguiendo las líneas dibujadas anteriormente con la ayuda de un bisturí estéril.
- 2º. Con unas pinzas estériles coger el cuadradito de agar y ponerlo en el centro de un portaobjetos. El portaobjetos deberá haberse limpiado anteriormente con alcohol y flameado.

3º. Coger con el asa de siembra, esterilizada y humedecida, un poco de muestra.

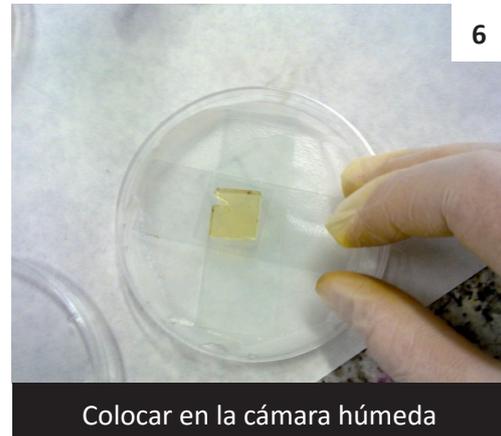
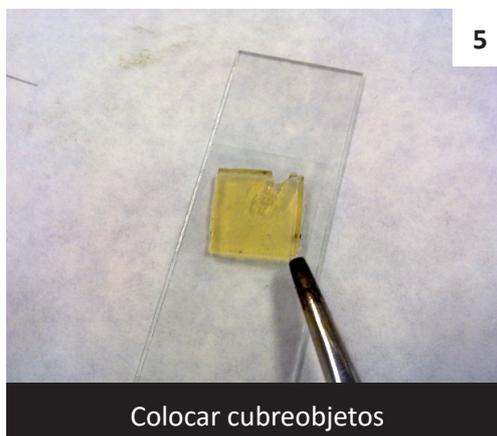
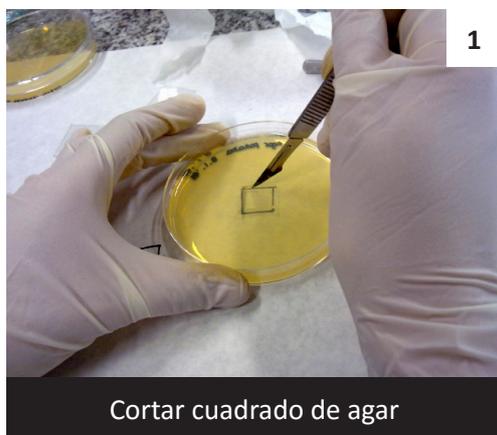
4º. Sembrar tocando con el asa en los cuatro laterales del cuadrado.

5º. Colocar un cubreobjetos limpio sobre el agar.

6º. Colocar el portaobjetos en una placa con papel de filtro humedecido y dos capilares.

7º. Incubar a 25°C el tiempo necesario para el crecimiento del hongo.

PROCEDIMIENTO EN IMÁGENES



RESULTADOS

- Indica con una fotografía el resultado obtenido.
- Explica lo que observas.

VISIÓN MICROSCÓPICA

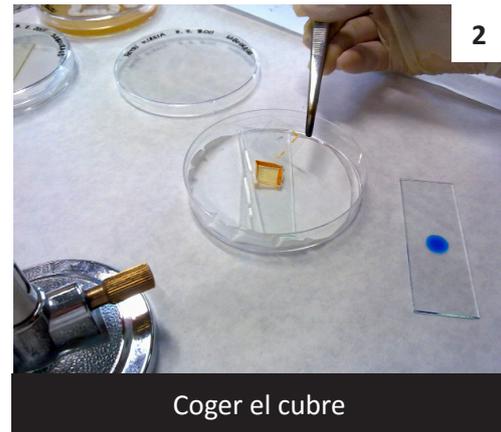
MATERIAL

- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Pipeta Pasteur.
- Colorante azul de lactofenol.
- Muestra ya incubada (técnica del cuadradito de agar).
- Pinzas.
- Mechero Bunsen.
- Microscopio.

TÉCNICA A

- 1º. Cogemos un portaobjetos, lo limpiamos con alcohol y lo flameamos.
- 2º. Con unas pinzas esterilizadas cogemos el cubreobjetos que habíamos puesto sobre el cuadradito de agar.
- 3º. Ponemos una gota de azul de lactofenol en el porta.
- 4º. Poner el cubre sobre la gota de azul de lactofenol.
- 5º. Observar al microscopio a 40x.

PROCEDIMIENTO EN IMÁGENES



TÉCNICA B

- 1º. Coger un cubreobjetos, limpiar con alcohol y flamear.
- 2º. Con las pinzas esterilizadas retiramos el cuadradito de agar que quedará sobre el portaobjetos.
- 3º. En el portaobjetos ponemos una gota de azul de lactofenol.
- 4º. Poner el cubreobjetos limpio sobre la gota de azul de lactofenol.
- 5º. Observar al microscopio a 40x.

RESULTADOS

- Indica con una fotografía los resultados microscópicos obtenidos.
- Explica lo que observas.